

**Diagnóstico direto do complexo  
*Mycobacterium tuberculosis* em  
tecidos de bovinos e bubalinos  
por *nested-PCR***





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*

*Embrapa Gado de Corte*

*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 35***

## **Diagnóstico direto do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de bovinos e bubalinos por *nested-PCR***

*Cristina Pires de Araújo*

*Ana Luiza Alves Rosa Osório*

*Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge*

*Carlos Alberto do Nascimento Ramos*

*Antônio Francisco de Souza Filho*

*Carlos Eugênio Soto Vidal*

*Agueda Palmira Castagna de Vargas*

*Eliana Roxo*

*Adalgiza Rocha*

*Antônio Augusto Fonseca Júnior*

*Marcio Roberto Silva*

*José Diomedes Barbosa Neto*

*Valéria Duarte Cerqueira*

*Flávio Ribeiro de Araújo*

Embrapa

Brasília, DF

2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Corte**

Av. Rádio Maia, 830 Vila Popular, CEP 79106-550

Campo Grande, MS

Fone: (67) 3368 2000 / Fax: (67) 3368 2180

<http://www.embrapa.br/gado-de-corte>

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Ronney Robson Mamede*

Secretário-Executivo: *Rodrigo Carvalho Alva*

Membros: *Elane de Souza Salles, Lucimara Chiari, Davi José Bungenstab, Andréa Alves do Egito, Roberto Giolo de Almeida, Guilherme Cunha Malafaia*

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto e Editoração Eletrônica: *Rodrigo Carvalho Alva*

Foto da capa: Flávio Ribeiro Araújo

**1ª edição** - Versão online (2015)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Gado de Corte.**

---

Diagnóstico direto do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de bovinos e bubalinos por nested-PCR [recurso eletrônico] / Cristina Pires de Araújo... [et al]. – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2015.

24 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN1983-974X ; 35).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/bp/BP35.pdf>>

Título da página da Web (acesso em 20 de outubro de 2015).

Outros autores: Cristina Pires de Araújo; Ana Luiza Alves Rosa Osório; Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge; Carlos Alberto do Nascimento Ramos; Antônio Francisco de Souza Filho; Carlos Eugênio Soto Vidal; Agueda Palmira Castagna de Vargas; Eliana Roxo; Adalgiza Rocha; Antônio Augusto Fonseca Júnior; Marcio Roberto Silva; José Diomedes Barbosa Neto; Valéria Duarte Cerqueira; Flávio Ribeiro de Araújo.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. bovinos bubalinos 3. nested-PCR. I. Araújo, Cristina Pires de. II. Osório, Ana Luisa Alves Rosa. III. Jorge, Kláudia dos Santos Gonçalves. IV. Ramos, Carlos Alberto do Nascimento. V. Filho, Antônio Francisco de Souza. VI. Vidal, Carlos Eugênio Soto. VII. Vargas, Agueda Palmira Castagna de. VIII. Roxo, Eliana. IX. Rocha, Adalgisa. X. Júnior, Antônio Augusto Fonseca. XI. Silva, Marcio Roberto. XII. Neto, José Diomedes Barbosa. XIII. Cerqueira, Valéria Duarte. XIV. Araújo, Flávio Ribeiro de.

# Sumário

Resumo .....	4
Abstract.....	6
Introdução.....	8
Material e métodos.....	9
Resultados .....	11
Discussão .....	16
Conclusões.....	19
Agradecimentos .....	19
Referências .....	20

# Diagnóstico direto do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de bovinos e bubalinos por *nested*-PCR

*Cristina Pires de Araújo<sup>1</sup>; Ana Luiza Alves Rosa Osório<sup>2</sup>; Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge<sup>3</sup>; Carlos Alberto do Nascimento Ramos<sup>4</sup>; Antônio Francisco de Souza Filho<sup>5</sup>; Carlos Eugênio Soto Vidal<sup>6</sup>; Agueda Palmira Castagna de Vargas<sup>7</sup>; Eliana Roxo<sup>8</sup>; Adalgiza Rocha<sup>9</sup>; Antônio Augusto Fonseca Júnior<sup>10</sup>; Marcio Roberto Silva<sup>11</sup>; José Diomedes Barbosa Neto<sup>12</sup>; Valéria Duarte Cerqueira<sup>13</sup>; Flávio Ribeiro de Araújo<sup>14</sup>*

## Resumo

No diagnóstico post-mortem da tuberculose bovina, a cultura bacteriana e os testes bioquímicos são atualmente realizados para a caracterização do agente etiológico. O cultivo leva até 90 dias para ser concluído além da necessidade da complementação por testes

<sup>1</sup>Médica-Veterinária, estudante de doutorado do Programa de pós-graduação em Ciência Animal FAMEZ/UFMS. Endereço eletrônico: tinaraujo2@hotmail.com; <sup>2</sup>Médica-Veterinária, D.Sc; professora do Programa de pós-graduação em Ciência Animal FAMEZ/UFMS. Endereço eletrônico: ana.osorio@ufms.br; <sup>3</sup>Médica-Veterinária, D.Sc; professora do Programa de pós-graduação em Ciência Animal FAMEZ/UFMS. Endereço eletrônico: klaudia.jorge@ufms.br; <sup>4</sup>Médico-Veterinário, D.Sc; Bolsista DTI- CNPq. Endereço eletrônico: can-ramos@hotmail.com; <sup>5</sup>Médico-Veterinário, estudante de mestrado do Programa de pós-graduação em Ciência Animal FAMEZ/UFMS. Endereço eletrônico: antonio-souza filho@gmail.com; <sup>6</sup>Médico-Veterinário, estudante de doutorado do programa de pós graduação em Medicina Veterinária/UFMS, Rio Grande do Sul. Endereço eletrônico: carlos.vidal@agricultura.gov.br; <sup>7</sup>Médica-Veterinária, D.Sc; professora do programa de pós graduação em Medicina Veterinária/UFMS, Rio Grande do Sul. Endereço eletrônico: agueda.vargas@gmail.com; <sup>8</sup>Médica-Veterinária, D.Sc; Pesquisadora Instituto Biológico de São Paulo. Endereço eletrônico: roxo@biologico.sp.gov.br; <sup>9</sup>Bióloga, D.Sc; Pesquisadora da Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro. Endereço eletrônico: adstrocha@hotmail.com; <sup>10</sup>Farmacêutico, D.Sc; Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais. Endereço eletrônico: augustofj@yahoo.com.br; <sup>11</sup>Médico-Veterinário, D.Sc; Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Endereço eletrônico: mrsilva@cnpqgl.embrapa.br; <sup>12</sup>Médico-Veterinário, D.Sc; Professor do programa de pós graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará. Endereço eletrônico: diomedes@ufpa.br; <sup>13</sup>Médica-Veterinária, D.Sc; Professora adjunto Universidade Federal do Pará. Endereço eletrônico: valiria@ufpa.br; <sup>14</sup>Médico-Veterinário, D.Sc; Pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. Endereço eletrônico: flabio.araujo@embrapa.br

bioquímicos. O diagnóstico por meio de testes moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), pode proporcionar resultados rápidos e confiáveis, diminuindo significativamente o tempo para obtenção de resultados. Neste estudo, um sistema de *nested-PCR*, tendo como alvo o gene *rv2807*, com uma PCR convencional, seguida de amplificação em tempo real, foi desenvolvido para a detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) diretamente a partir de homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos. A sensibilidade e especificidade das reações foram avaliadas com amostras de DNA extraídas de micobactérias tuberculosas e não-tuberculosas, além de outras espécies *Actinomycetales* e amostras de DNA extraído diretamente de homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos. O sistema de *nested-PCR* mostrou uma alta especificidade para o CMT e uma sensibilidade clínica (67,4%) comparável à obtida pela cultura (66,3%). A sensibilidade clínica foi maior em bovinos apresentando lesões visíveis do que em bovinos sem lesões visíveis. A reação de *nested-PCR* foi capaz de detectar CMT em bovinos com teste tuberculínico intradérmico comparativo positivo, sem lesões visíveis e com culturas negativas.

**Termos para indexação:** tuberculose bovina e bubalina; *nested-PCR*; real-time PCR; tecido; inspeção sanitária.

## ***Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in bovine and bubaline tissues by nested-PCR***

*Cristina Pires de Araújo<sup>1</sup>; Ana Luiza Alves Rosa Osório<sup>2</sup>; Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge<sup>3</sup>; Carlos Alberto do Nascimento Ramos<sup>4</sup>; Antônio Francisco de Souza Filho<sup>5</sup>; Carlos Eugênio Soto Vidal<sup>6</sup>; Agueda Palmira Castagna de Vargas<sup>7</sup>; Eliana Roxo<sup>8</sup>; Adalgiza Rocha<sup>9</sup>; Antônio Augusto Fonseca Júnior<sup>10</sup>; Marcio Roberto Silva<sup>11</sup>; José Diomedes Barbosa Neto<sup>12</sup>; Valéria Duarte Cerqueira<sup>13</sup>; Flávio Ribeiro de Araújo<sup>14</sup>*

### **Abstract**

Post-mortem *bacterial culture and specific biochemical tests are currently performed for the characterization of the etiologic agent of bovine tuberculosis. Culture takes up to 90 days to develop and needs bioquimic tests. The diagnosis by molecular tests such as PCR can provide fast and reliable results, significantly decreasing the time of confirmation. In this study, a nested-PCR system, targeting rv2807, with a conventional PCR followed by real-time PCR reaction, were developed to detect Mycobacterium tuberculosis complex (CMT) organisms directly from bovine and bubaline tissue homogenates. Sensitivity and specificity of the reactions were evaluated with DNA samples extracted from tuberculous and non-tuberculous mycobacteria, besides other Actinomycetales species, and DNA samples extracted directly from bovine and bubaline tissue homogenates. The nested-PCR system showed high specificity for CMT, and clinical sensitivity (67.4%) comparable to culture (66.3%). Clinical sensitivity was higher in cattle showing visible lesions than in cattle with no visible lesions, although nested-PCR was able to detect CMT from cattle with*



*positive comparative intradermal tuberculin test, with no visible lesions and negative cultures.*

**Index terms:** *Bovine and bubaline tuberculosis; nested-PCR; real-time PCR; tissue; sanitary inspection.*

## Introdução

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica, causada por membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), incluindo *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. cannetii* (BROSCH et al., 2002). Em bovinos, embora *M. bovis* seja o agente mais comum da tuberculose, outras espécies do CMT foram descritas, tais como *M. tuberculosis* (AMENI et al., 2011), *M. caprae* (SAHRAOUI et al., 2009) e *M. africanum* (WEBER et al., 1998).

No Brasil, o controle da tuberculose bovina e bubalina envolve o abate de animais infectados, definidos pela reação intradérmica à tuberculina (*Purified Protein Derivative* - PPD). Além disso, a vigilância epidemiológica em matadouros é realizada, com inspeção sanitária de todos os animais abatidos para fins de consumo (BRASIL, 2004). No entanto, não há nenhuma coleta sistemática de lesões que seja compatível com a tuberculose (LCT-lesão compatível com tuberculose) para a sua subsequente cultura e confirmação da doença.

Com a globalização econômica, as barreiras tarifárias foram substituídas por barreiras sanitárias. Há uma crescente pressão dos mercados importadores para o diagnóstico definitivo da tuberculose em LCT de bovinos e bubalinos, nos países exportadores.

Embora a cultura bacteriológica seja um método confiável para a detecção de CMT, é um método moroso, levando até 90 dias para ser concluído, porque os membros deste complexo crescem lentamente, comparados com os padrões bacteriológicos (COSTELLO et al., 1998; MILLER et al., 2002; SCHMITT et al., 2002; DROBNIEWSKI et al., 2003; HINES et al., 2006; de LISLE et al., 2008).

Neste sentido, ressaltam-se os sistemas moleculares de diagnóstico, especialmente aqueles baseados na tecnologia de PCR em tempo real, uma vez que são mais rápidos e mostram maiores possibilidades de automação (SOINI; MUSSER, 2001). Embora diversos sistemas de

PCR em tempo real tenham sido desenvolvidos para detectar CMT diretamente a partir de amostras biológicas em seres humanos, o desenvolvimento de procedimentos para a detecção de CMT em homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos tem sido muito limitado (TAYLOR et al., 2001; PARRA et al., 2008; TRACHER et al., 2011). Os principais obstáculos são a dificuldade em extrair o DNA micobacteriano em amostras de bovino e bubalino, pela baixa carga micobacteriana e pela estrutura da amostra biológica em si, o que geralmente contém fibrose e calcificação, que dificultam o acesso ao DNA a ser detectado (LIEBANA et al., 1995). Outra dificuldade é que geralmente a concentração de DNA de micobactérias viáveis é normalmente baixa, em comparação com a concentração de DNA do hospedeiro (THACKER et al., 2011). Um terceiro problema é que bovinos com reações positivas ao PPD nem sempre mostram lesões visíveis durante o abate no matadouro (COSTELLO et al., 1997), devido a infecções recentes por micobactérias.

Para superar os problemas com a sensibilidade na detecção de micobactérias patogênicas diretamente a partir de tecidos de bovinos ou bubalinos, este artigo descreve uma *nested*-PCR, com uma combinação de uma primeira PCR convencional e uma segunda reação de PCR em tempo real, para a detecção do CMT em homogeneizados de tecidos.

## Material e métodos

**Amostras biológicas** - As estirpes de referência de bactérias utilizadas para testes de sensibilidade ou especificidade e para a otimização da *nested*-PCR estão listadas na Tabela 1, incluindo os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*), complexo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium*), Actinomycetales atípicos (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium goodii* e *Mycobacterium goodii*), e Actinomycetales não micobacterianos (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Rhodococcus equi*).

Tabela 1. Amostras de bactérias utilizadas para avaliação de especificidade e sensibilidade analítica para *nested*-PCR.

Espécie	Cepa/origem
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	LGCM/FIOCRUZ*
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 19977/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 25291/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium bovis</i>	AN5 strain, Agricultural Ministry – LANAGRO MG
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	ATCC 6841/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium gordonae</i>	ATCC 14470/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium kansasii</i>	ATCC 12478/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37Rv/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 700044/FIOCRUZ
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939/FIOCRUZ

\*Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Além disso, DNAs obtidos a partir de amostras de cultura isoladas de lesões de bovinos naturalmente-infectados com *M. bovis* do LANAGRO, Minas Gerais, Brasil (n = 50), ou do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil (n = 42); DNAs isolados a partir de 170 amostras de cultura de *M. tuberculosis* oriundos de isolados de expectoração humana com tuberculose (LABMAM, Fiocruz, RJ, Brasil), e DNAs purificados a partir de amostras de cultura (n = 3) de *M. avium* do LANAGRO, foram utilizados. A identificação de *M. bovis* e *M. avium* foi realizada por métodos bioquímicos (amostras de LANAGRO) ou por PCR com iniciadores JB21 e JB22 para CMT (RODRIGUEZ et al., 1995). A identificação de estirpes de *M. tuberculosis* foi realizada

por *spoligotyping* (KAMERBEEK et al., 1997) e por PCR para detectar o polimorfismo do gene *pncA* (BAROUNI et al., 2004).

Estirpe de referência de *M. bovis* AN5 foi cultivada em meio *Stonebrink*, enquanto que as outras estirpes de referência de *Mycobacterium* sp foram cultivadas em meio de *Lowenstein Jensen*. Cepas de não-micobactérias não foram cultivadas e o DNA foi purificado diretamente a partir da suspensão bacteriana liofilizada.

**Isolamento de DNA bacteriano cepas padrão** – O DNA das cepas bacterianas de referência foi purificado com o *kit Blood & Tissue Dneasy* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e concentração de amostras de DNA foram avaliadas por espectrofotometria (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific) e por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com SYBR Gold (Invitrogen).

**Iniciadores e sondas** – Com base em sequências de DNA de membros do CMT, disponíveis no Genbank-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), alvos específicos foram selecionados para a amplificação de DNA. Os iniciadores e sondas para a *nested*-PCR foram desenhados com programa Primer Express v2.0 (Applied Biosystems).

O alvo selecionado para a amplificação foi *rv2807* (ID:888907), um gene de 443 pb que codifica uma proteína hipotética do complexo *M. tuberculosis*.

Dois conjuntos de iniciadores foram desenhados: externos, para amplificação por PCR convencional, e internos e sonda marcada, para amplificação por PCR em tempo real com *TaqMan* MGB. A primeira reação foi incluída para enriquecimento do DNA do CMT, pois uma maior concentração relativa de DNA isolado a partir de tecidos do hospedeiro (bovino/bubalino) pode interferir com a amplificação do gene alvo. As sequências de iniciadores e a sonda estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Iniciadores (*primers*) utilizados na primeira reação (PCR convencional) e segunda reação de PCR em tempo real para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT).

Gene alvo	Sequência (5' ▶ 3')
rv2807	Externo <i>forward</i> : GGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAG
	Externo <i>reverse</i> : GCCGCGAGCGAGTCTGGGCGATGTC
	Interno <i>forward</i> : MTC: CATTGCTGCGTAATTCGATCA
	Sonda: 6FAM CATCCACACCTGTTTCG MGBNFQ
	Interno <i>reverse</i> : MTC: GACCTTGGGCGCCTCAT

**Padronização da *nested*-PCR** – As PCRs convencionais foram realizadas em volume de 25µL, contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 7,5 pmol de cada iniciador, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Sigma), e 400 ng de DNA.

As reações de segundo passo (PCR em tempo real) para o CMT foram realizadas em volume de 12,5 µL, contendo 6,25 µL de *TaqMan* Master Mix (Applied Biosystems), 600 nM de cada iniciador, 100 nM da sonda e 3 µL da primeira reação de PCR.

As amplificações iniciais foram realizadas em termociclador MJ Mini Biorad. A desnaturação inicial foi realizada a 95°C durante 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto e 30 segundos, anelamento a 65°C durante 30 segundos, e extensão a 72°C durante 45 segundos. Um único passo de 72°C de extensão final foi realizado durante 3 minutos. As amplificações por PCR em tempo real foram realizadas em termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, EUA). A desnaturação inicial foi realizada a 95°C durante 10 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e anelamento extensão a 62°C durante 30 segundos.

Para todas as reações de *nested*-PCR, os controles positivos com DNA de *M. bovis* AN5 e DNA de *M. tuberculosis* H37Rv, bem como um controle negativo, sem DNA, foram incluídos.

Os iniciadores e sondas do CMT foram testados quanto à especificidade com 50 ng de DNA de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium smegmatis* e *Rhodococcus equi*. Para testar inibidores da PCR, alíquotas de DNA das espécies acima utilizadas para a avaliação da especificidade foram misturados com DNA de *M. bovis* AN5 e testadas por *nested*-PCR. As condições de amplificação foram as mesmas para o alvo específico.

Os iniciadores e sonda para o CMT foram testados quanto à sensibilidade analítica com diluições em série de DNA a partir de cepas de referência de *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv, em triplicata, mas com uma mistura de reação para cada repetição. As amostras de DNA foram testadas apenas por PCR em tempo real, apenas por PCR convencional, e por *nested*-PCR (ambas as reações convencional e em tempo real).

Os iniciadores e sonda para CMT foram também testados quanto à sensibilidade com as amostras de DNA de 92 culturas de *M. bovis* de bovinos naturalmente infectados, fornecidas pelo LANAGRO e Instituto Biológico, e com 170 amostras de DNA de culturas de *M. tuberculosis* de humanos naturalmente infectados.

**Deteção direta do CMT por tecidos em bovinos e búfalos** – A detecção direta de CMT em homogeneizados de tecidos foi realizada com os seguintes grupos de animais:

a) 70 bovinos positivos ao teste tuberculínico cervical comparativo (TCC), incluindo 45 bovinos com lesões compatíveis com tuberculose (LCT) e 25 sem lesões visíveis (SLV). Esses animais, de diferentes idades e categorias zootécnicas (leite e carne), foram abatidos seguindo

as recomendações do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT (BRASIL, 2004).

b) 20 bovinos mostrando LCT durante a inspeção de sanitária de rotina. Estes animais não foram testados para tuberculose bovina por teste cutâneo intradérmico.

c) 23 bovinos TCC negativos. Estes animais eram provenientes de uma fazenda de exploração mista (leite e carne), com história prévia de tuberculose bovina.

d) 46 búfalos (*Bubalus bubalis*), incluindo 9 animais TCC + com LST, 7 animais TCC + SLV e 30 animais não testados pelo TCC, mas mostrando LCT durante a inspeção de abate de rotina.

Os TCCs foram realizados de acordo com o regulamento do PNCEBT (BRASIL, 2004). A reação TCC positiva foi definida como um aumento relativo da espessura da pele no local de injeção do PPD bovino de pelo menos 4 mm acima do que o aumento da espessura da pele no local de injeção do PPD aviário (BRASIL, 2004).

As lesões compatíveis com tuberculose (LCT) foram obtidas neste estudo a partir de linfonodos hepáticos, ilíacos, mandibulares, mediastinais, mesentéricos, pré-escapulares, linfáticos, retrofaríngeos e traqueobrônquicos; ou dos pulmões, amídalas, fígado ou diafragma. Quando os animais não mostraram lesões visíveis (SLV), linfonodos hepáticos, mediastinais, mesentéricos, retrofaríngeos e traqueobrônquicas foram coletados.

Os órgãos foram conservados em gelo até a chegada ao laboratório, onde foram mantidos a -30°C até o processamento. Os órgãos foram descongelados e divididos em duas amostras, uma para a cultura e a outra para o isolamento de DNA.

Para o isolamento do DNA, as amostras foram cortadas em pedaços de 100 mg, correspondente à transição entre as lesões macroscópicas



e a área aparentemente saudável. Estas peças foram completamente homogeneizadas com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). A partir destas suspensões de tecidos, 200  $\mu$ L foram usados para o isolamento de DNA com *kit Blood & Tissue Dneasy* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. As reações de *nested*-PCR foram realizadas como descrito no item anterior.

Para a cultura, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas com uma quantidade equivalente de água e areia estéril. As suspensões de tecido foram filtradas em gaze estéril e centrifugadas a 1200 xg durante 15 minutos. Os sedimentos foram suspensos em 2 mL de solução estéril, descontaminadas pelo método de Petroff e cultivadas em meio de Stonebrink. As culturas foram incubadas a 37°C e observadas semanalmente até 90 dias. Os esfregaços das colônias isoladas foram corados com Ziehl-Neelsen (ZN) para BAAR. Todas as culturas BAAR + foram analisadas por PCR com os iniciadores JB21 e JB22 para CMT (RODRIGUEZ et al., 1995).

Os animais foram considerados positivos para a tuberculose quando pelo menos uma amostra de tecido apresentava amplificação positiva na *nested*-PCR ou mostrava culturas BAAR +, confirmadas por PCR com iniciadores JB21 e JB22.

**Análise estatística** – Os testes de qui-quadrado ou exato de Fisher foram realizados para avaliar a correlação entre as variáveis categóricas. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

A análise *in silico* das sequências dos iniciadores e sondas está mostrada na Figura 1. Identidade total foi detectada com espécies do CMT, incluindo *M. bovis* (incluindo BCG), *M. tuberculosis*, *M. africanum*, exceto *M. canettii*, com quem houve identidade parcial, juntamente com *M. abscessus*, *M. avium*, *M. gilvum*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*, *M. rhodesiae*, *M. smegmatis* e *M. ulcerans*.

[illegible]

Fig. 1. Análise por Blastn das seqüências de iniciadores e sondas *rv2807* para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*

A especificidade da *nested*-PCR para CMT foi testada com DNA de *C. pseudotuberculosis*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. smegmatis* e *R. equi*. Não houve amplificação quando 50 g de DNA destes microrganismos foram utilizados. Alíquotas de DNA de microrganismos não-alvo foram adicionadas com DNA de *M. bovis* AN5 para testar os inibidores de PCR e amplificações foram detectadas, mostrando que não houve interferência dos inibidores de PCR.

No que diz respeito à sensibilidade analítica, os iniciadores e sondas para CMT foram testados por PCR convencional, PCR em tempo real e *nested*-PCR. DNA de *M. bovis* AN5 foi detectado até 390 pg com a PCR convencional, 24,37 pg com PCR em tempo real, e 1,52 pg com *nested*-PCR. DNA de *M. tuberculosis* H37Rv foi detectado até 6,25 pg com a PCR convencional, 24,37 pg com PCR em tempo real e 6,09 pg com *nested*-PCR.

Das 50 amostras de DNA isoladas de culturas de lesões de bovinos naturalmente-infectados com *M. bovis* do LANAGRO - Ministério da Agricultura, 49 (98,8%) foram positivos na *nested*-PCR para CMT. Todas as 42 (100%) amostras de DNA isolado de culturas de *M. bovis* do Instituto Biológico, em São Paulo, foram positivas na *nested*-PCR para CMT. Com relação aos DNAs de 170 amostras de cultura de *M. tuberculosis* isoladas de escarro de pessoas com tuberculose (LABMAM, Fiocruz, RJ, Brasil), todas (100%) foram positivas na *nested*-PCR para CMT.

As amostras de tecidos de 113 bovinos foram testadas diretamente por *nested*-PCR para CMT. Os resultados da *nested*-PCR e cultura estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados de *nested*-PCR para complexo *Mycobacterium tuberculosis* e cultura de 113 homogeneizados de tecidos bovino.

Status	Número total	Teste	Número de positivos (%)	p-value
TCC + e LCT	45	Nested-PCR +	32 (71,1)	0,319
		Culturas BAAR + *	37 (82,2)	
TCC + e SLV	25	Nested-PCR +	12 (48,0)	0,862
		Culturas BAAR + *	10 (40,0)	
TCC - e SLV	23	Nested-PCR +	0 (0,0)	0,999
		Culturas BAAR + *	1 (4,3)	
Sem TCC e LCT	20	Nested-PCR +	9 (45,0)	0,319
		Culturas BAAR + *	5 (25,0)	

TCC = Teste tuberculínico cervical comparativo

BAAR = Bacilos álcool-ácido resistentes

\*Confirmados por PCR usando iniciadores JB21 e JB22 (RODRIGUEZ et al., 1995).

Amostras de tecido de 46 búfalos foram testadas diretamente por *nested*-PCR para CMT. Os resultados da *nested*-PCR e cultura estão mostrados na Tabela IV.

Amostras de tecido de 46 búfalos foram testadas diretamente por *nested*-PCR para CMT. Os resultados da *nested*-PCR e cultura estão mostrados na Tabela IV.

Tabela 4. Nested-PCR para complexo *Mycobacterium tuberculosis* e resultados de cultura de 46 homogeneizados de tecidos de bubalinos.

Status	Número total	Teste	Número de positivos (%)	p-value
TCC + e LCT	9	Nested-PCR +	9 (100)	1
		Culturas BAAR + *	9 (100)	
TCC + e SLV	7	Nested-PCR +	5 (71,4)	0,03
		Culturas BAAR + *	1 (14,3)	
Sem TCC e LCT	30	Nested-PCR +	15 (50,0)	0,012
		Culturas BAAR + *	5 (16,7)	

TCC = Teste tuberculínico Cervical Comparativo

BAAR = Bacilos álcool ácido resistentes

\*Confirmados por PCR usando iniciadores JB21 e JB22 (RODRIGUEZ et al., 1995).

Dos 54 animais TCC + (bovinos e bubalinos) mostrando LCT, 41 (75,9%) foram positivos na *nested*-PCR, e 46 (85,2%) foram positivos na cultura, confirmada por PCR JB21/JB22 ( $p = 0,329$ ). Dos 32 animais TCC + (bovinos e bubalinos) mas SLV, 17 (53,1%) foram positivos para *nested*-PCR, e 11 (34,4%) foram positivos na cultura, confirmada por PCR JB21/JB22 ( $p = 0,207$ ). A detecção de animais positivos para a tuberculose foi estatisticamente superior no grupo TCC +/LCT + que no grupo TCC +/SLV, na *nested*-PCR ( $p = 0,05$ ) e cultura ( $p < 0,0001$ ).

Dos 50 bovinos e bubalinos com LCT, mas sem TCC, 24 (48%) foram positivos na *nested*-PCR e 10 (20%) foram positivos na cultura, confirmada por PCR JB21/JB22 ( $p = 0,006$ ).

Considerando o TCC um teste referência para identificar bovinos *in vivo* infectados com *M. bovis*, houve 86 animais TCC + (bovinos e bubalinos), dos quais 57 animais foram positivos na cultura, que determina uma sensibilidade relativa de 66,3%. Houve 58 animais positivos na *nested*-PCR, resultando em uma sensibilidade relativa de 67,4% ( $p = 0,006$ ).

Dos 86 animais TCC +, 32 (37,2%) apresentaram-se SLV durante a inspeção de abate, dos quais 7 (21,9%) foram positivos na cultura e *nested*-PCR para CMT.

No grupo de 21 animais TCC +/SLV com culturas negativas, houve 10 animais positivos na *nested*-PCR para CMT.

Na análise dos 104 animais que mostraram LCT, houve 65 animais positivos na *nested*-PCR (62,5%) e 56 animais positivos na cultura (53,8%) ( $p = 0,261$ ).

Na análise de 23 animais TCC - de uma fazenda com história prévia de tuberculose bovina, a *nested*-PCR para CMT não foi capaz de detectar qualquer animal positivo, mas um animal (4,3%) foi positivo na cultura, confirmado com PCR JB21/JB22.

## Discussão

Este estudo teve por objetivo o desenvolvimento de um sistema de diagnóstico *post-mortem* rápido da tuberculose bovina e bubalina, aplicável diretamente para amostras clínicas. O objetivo foi desenvolver um método preciso, que pudesse reduzir substancialmente o tempo entre a detecção de LCT e o diagnóstico etiológico (2 dias), em comparação com o método tradicional a cultura, o que demora cerca de 90 dias.

As análises de uma série de diluições de DNA a partir de estirpes de referência de *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv revelou uma maior sensibilidade na *nested*-PCR, em comparação com PCR em tempo real sozinha ou PCR convencional sozinha, embora esta diferença seja mais notável comparando *nested*-PCR ou PCR em tempo real com a PCR convencional. Porém, espera-se que o impacto da utilização da abordagem de *nested*-PCR será maior sobre a sensibilidade clínica, já que os inibidores de PCR e micobactérias atípicas pode interferir com o desempenho da PCR. A escolha de uma estratégia de *nested*-PCR (PCR convencional seguida de PCR em tempo real) também foi considerada por Thacker et al. (2011), resultando no aumento da sensibilidade clínica na detecção de *M. bovis* diretamente a partir de amostras de tecido.

A grande maioria dos casos de tuberculose está relacionada com as espécies que formam o complexo *M. tuberculosis*, incluindo *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. cannetii*. Em bovinos, embora *M. bovis* seja o agente mais comum encontrado em LCT, outras espécies de micobactérias foram descritas, tais como *M. tuberculosis* (AMENI et al., 2011), *M. caprae* (SAHRAOUI et al., 2009), *M. africanum* (WEBER et al., 1998), *M. avium paratuberculosis* (KHAN et al., 2010), *M. fortuitum* e *M. intracellulare* (ASIIMWE et al., 2009).

Análise *in silico* das sequências de DNA de iniciadores e sondas para o CMT mostrou identidade total com os membros do CMT, exceto *M.*

*canettii*, com identidade parcial. No entanto, *M. canettii* é um patógeno humano (BROSCH et al., 2002), considerado raro e confinado a países da África Oriental (REDDINGTON et al., 2011).

A especificidade da *nested*-PCR foi analisada *in vitro*. Não houve amplificação quando iniciadores e sondas para CMT foram usadas com DNA das micobactérias atípicas *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii* e *M. smegmatis*, nem com DNA de *R. equi* e *C. pseudotuberculosis*. Isto é particularmente importante, uma vez que a presença de micobactérias ambientais em linfonodos submetidas a testes de diagnóstico podem confundir os ensaios que não possuem especificidade suficiente (THACKER et al., 2011). Além disso, outros *Actinomycetales* relacionados, como *R. equi* e *C. pseudotuberculosis*, podem causar lesões confundíveis com tuberculose (FLYNN et al., 2001; SAHRAOUI et al., 2009).

No que diz respeito à sensibilidade clínica, as diferenças entre *nested*-PCR para CMT e cultura não foram estatisticamente significativas na detecção de animais TCC +/LCT, nem na detecção de animais TCC +/SLV. No entanto, a *nested*-PCR e a cultura mostraram uma maior sensibilidade na detecção de animais TCC +/LCT que aqueles SLV. Este é um claro indicador da carga de micobactérias em cada grupo de lesões. A mesma tendência de maior sensibilidade da PCR no grupo de animais com LCT foi detectada por Parra et al. (2008), no entanto, a PCR não detectou animais positivos no grupo SLV quando aqueles apresentaram culturas negativas. No presente estudo, no grupo de animais TCC +/SLV, a *nested*-PCR para CMT foi capaz de detectar animais positivos para a tuberculose, mesmo quando eles apresentaram culturas negativas.

Menores taxas de positividade foram encontradas na *nested*-PCR e cultura no grupo de animais sem TCC que apresentaram LCT durante inspeção após abate. Uma das possíveis razões é a presença de lesões granulomatosas causadas por outros microrganismos. O isolamento de micobactérias atípicas em bovinos com lesões de tuberculose disseminada costuma ser incomum, devido ao caráter não-progressivo, crônico

das infecções. No entanto, alguns casos de doença disseminada têm sido relatados (OLOYA et al., 2007). Lesões decorrentes de outros microrganismos não-micobactérias também podem ser confundidas com tuberculose, como *Rhodococcus*, *Actinobacillus*, *Arcanobacterium* e *Nocardia*, entre outros (de LISLE et al., 2002).

Várias metodologias foram previamente utilizadas para aumentar a sensibilidade da PCR em tempo real, para a detecção de *Mycobacterium* sp. diretamente a partir de homogeneizados de tecido. Parra et al. (2008) utilizaram uma sonda de captura para isolar o DNA de micobactérias a partir de homogeneizados de tecido, obtendo uma sensibilidade semelhante (65,6%) à relatada aqui. Taylor et al. (2007) relataram uma sensibilidade de 70% ao realizar a PCR diretamente em homogeneizados de tecidos, mas aumentou a sensibilidade para 91% quando a PCR foi realizada em DNA isolado a partir de lesões excisadas, em vez de tecidos inteiros. A limitação deste método é que o ensaio pode ser realizado apenas em tecidos que têm lesões visíveis, excluindo, assim, as amostras sem lesões prontamente aparentes. Thacker et al. (2011) utilizaram uma estratégia semelhante a este estudo, com uma primeira PCR convencional, seguida de uma reação em tempo real, tendo como alvo IS6110, detectando 66,7% das amostras que apresentaram cultura positiva. Neste estudo, tendo o TCC como teste de referência, as sensibilidades relativas de 66,3% e 67,4% foram detectados pela cultura e *nested*-PCR, sem diferenças significativas entre os desempenhos dos dois testes. A abordagem *nested*-PCR permitiu uma redução substancial do tempo entre a aquisição de amostras e os resultados definitivos, sendo que a cultura pode levar até 90 dias, contrastando com 2 dias necessários para a *nested*-PCR. Tal melhoria na velocidade de diagnóstico ocorreu sem detrimento à sensibilidade.

Uma das preocupações com a *nested*-PCR, especialmente reações em tempo real, é a possibilidade de contaminação cruzada. Durante todo o processo de extração de DNA, as luvas foram trocadas frequentemente. As purificações de DNA foram realizadas em um nível de biossegurança 3, as PCRs em uma câmara de fluxo laminar com luz UV. Con-



juntos separados de micropipetas foram usados para a purificação de DNA e para PCR. Ponteiras com filtro foram utilizadas rotineiramente. Superfícies e equipamentos em contato com tubos de amostras foram limpas antes de cada ensaio.

Durante a inspeção sanitária em matadouros, as principais preocupações são direcionadas para animais que apresentam lesões visíveis, que são considerados impróprios para o consumo. No entanto, pelo menos nas amostras de bovinos/bubalinos deste estudo, 37,2% dos animais apresentaram TCC + /SLV, a partir dos quais 21,9% foram positivas na cultura e *nested*-PCR. Isto levanta preocupações com a transmissão zoonótica, de *M. bovis*, já que as principais espécies do CMT encontrados em bovinos podem sobreviver ao processo de cozimento (VAN DER MERWE et al., 2009). Por esta razão, as políticas sanitárias envolvendo testes de PCR em animais TCC + /SLV devem ser consideradas.

Todos os 23 animais TCC- também foram negativos na *nested*-PCR, mas um animal foi positivo na cultura, confirmado por PCR com JB21/ JB22. A fazenda na qual estes animais foram criados tinha um histórico de tuberculose bovina. Animais com estágios avançados de tuberculose podem não reagir no TCC, mas, surpreendentemente, este animal não apresentou lesões visíveis.

## Conclusões

A utilização de PCR para detectar o complexo *M. tuberculosis* em homogeneizados de tecido proporciona um método mais rápido que a cultura para o diagnóstico da tuberculose bovina e bubalina, com a mesma sensibilidade. Uma validação inter-laboratorial do método e um estudo em grande escala são necessários para determinar se o método é adequado para a tuberculose bovina e bubalina brasileira no programa de erradicação.

## Agradecimentos

Suporte financeiro: CNPq (processo 578278/2008), FUNDECT (processo 23/200.152/2009), e CAPES.

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, por providenciar amostras de bactérias de referência.

## Referências

AMENI, G.; VORDERMEIER, M.; FIRDESSA, R.; ASEFFA, A.; HEWINSON, G.; GORDON, S.V.; BERG, S. *Mycobacterium tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. **The Veterinary Journal**, London, v. 188, n. 3, p. 359-61, 2011.

ASIIMWE, B.B.; ASIIMWE, J.; KALLENIOUS, G.; ASHABA, F.K.; GHEBREMICHAEL, S.; JOLOBA, M.; KOIVULA, T. Molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle carcasses at a city slaughterhouse in Uganda. **The Veterinary Record**, London, v.164, n. 21, p. 655-658, 2009.

BAROUNI, A.S.; AUGUSTO, C.J.; LOPES, M.T.P.; ZANINI, M.S.; SALAS, C.E. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 18, n. 3, p. 167-170, 2004.

BRASIL, (2004). Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT. Manual Técnico, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 2004, 188p.

BROSCH, R.; GORDON, S.V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L.M.; PYM, A.S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S.T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v.99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.

COSTELLO, E.; DOHERTY, M.L.; MONAGHAN, M.L.; QUIGLEY, F.C.; O'REILLY, P.F. A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. **The Veterinary Journal**. London, v.155, n. 3, p. 245-250, 1998.

COSTELLO, E.J.; EGAN, W.; QUIGLEY, F.C. O'REILLY, P.F. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. **The Veterinary Record**, London, v. 141, n. 9, 222-224, 1997.

DE JONG, B.C.; ANTONIO, M.; GAGNEUX, S. (2010). *Mycobacterium africanum*--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases** [electronic resource], San Francisco, v. 4, n. 9, e744.

DE LISLE, G.W.; BENGIS, R.G.; SCHMITT, S.M.; O'BRIEN, D.J. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. **Revue Scientifique et Technique /Office International des Epizooties**, Paris, v. 21, n. 2, p. 317-334, 2002.

DE LISLE, G.W.; KAWAKAMI, R.P.; YATES, G.F.; COLLINS, D.M. Isolation of *Mycobacterium bovis* and other mycobacterial species from ferrets and stoats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 3-4, p. 402-407, 2008.

DROBNIOWSKI, F.A.; GIBSON, A.; RUDDY, M.; YATES, M.D. Evaluation and utilization as a public health tool of a national molecular epidemiological tuberculosis outbreak database within the United Kingdom from 1997 to 2001. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 5, p. 1861-1868, 2003.

FLYNN, O.; QUIGLEY, F.; COSTELLO, E.; O'GRADY, D.; GOGARTY, A.; MC GUIRK, J.; TAKAI, S. Virulence-associated protein characterisation of *Rhodococcus equi* isolated from bovine lymph nodes. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 221-228, 2001.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J.C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOY, S.; GRONDIN, S.; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; DOGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER, P.R.; PARKHILL, J.; BARRELL, B.G.; COLE, S.T.; GORDON, S.V.; HEWINSON, R.G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, 2003.

HINES, N.; PAYEUR, J.B.; HOFFMAN, L.J. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, Columbia, v. 18, n. 3, p. 243-250, 2006.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 4, p. 907-914, 1997.

KHAN, F.A.; CHAUDHRY, Z.I.; ALI, M.I.; KHAN, S.; MUMTAZ, N.; AHMAD, I. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of cattle and buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 42, n. 4, p. 633-638, 2010.

LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; MATEOS, A.; VILAFRANCA, M.; GOMEZ-MAMPASO, E.;

TERCERO, J.C.; ALEMANY, J.; SUAREZ, G.; DOMINGO, M.; DOMINGUEZ, L. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 1, p. 33-36, 1995.

MILLER, J.M.; JENNY, A.L.; PAYEUR, J.B. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 15-23, 2002.

OLOYA, J.; KAZWALA, R.; LUND, A.; OPUDA-ASIBO, J. ; DEMELASH, B.; SKJERVE, E.; JOHANSEN, T.B.; DJØNNE, B. Characterisation of mycobacteria isolated from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda. **BMC Microbiology**, London, v. 7, p.95, 2007.

PARRA, A.; GARCIA, N.; GARCIA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; HERMOSO, J.M. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 3-4, p. 315-324, 2008.

REDDINGTON, K.; O'GRADY, J.; DORAI-RAJ, S.; NIEMANN, S.; VAN SOOLINGEN, D.; BARRY, T. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. **Public Library of Science One**, San Francisco, v. 6, n. 8, e23481, 2011.

RODRIGUEZ, J.G.; MEJIA, G.A.; DEL PORTILLO, P.; PATARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, Reading, v. 141, n. 9, p. 2131-2138, 1995.

SAHRAOUI, N.; MÜLLER, B.; GUETARNI, D.; BOULAHBAL, F.; YALA, D.; OUZROUT, R.; BERG, S.; SMITH, N.H.; ZINSSTAG, J. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. **BMC Veterinary Research**, London, v. 5, p. 4, 2009.

SCHMITT, S.M; O'BRIEN, D.J.; BRUNING-FANN, C.S.; FITZGERALD, S.D. Bovine tuberculosis in Michigan wildlife and livestock. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 969, p. 262-268, 2002.

SOINI, H.; MUSSER, J.M. Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 47, n. 5, p. 809-814, 2001.

TAYLOR, G.M.; WORTH, D.R.; PALMER, S.; JAHANS, K.; HEWINSON, R.G. Rapid detec-

tion of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research**, London, v. 13, n. 3, p. 12, 2007.

TAYLOR, M.J.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 4, p. 1272-1278, 2001.

THACKER, T.C.; HARRIS, B.; PALMER, M.V.; WATERS, W.R. Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. **BMC Veterinary Research**, London, v. 7, p. 50, 2011.

VAN DER MERWE, M.; BEKKER, J.L.; VAN DER MERWE, P.; MICHEL, A.L. Cooking and drying as effective mechanisms in limiting the zoonotic effect of *Mycobacterium bovis* in beef. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 80, n. 3, p. 142-145, 2009.

WEBER, A.; REISCHL, U.; NAUMANN, L. Demonstration of *Mycobacterium africanum* in a bull from North Bavaria. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v. 111, n. 1, p. 6-8, 1998.



---

*Gado de Corte*

CGPE 12278

**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

**Governo  
Federal**